

## Селекция и семеноводство

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ПАРТИЙ СЕМЯН САМООПЫЛЕННЫХ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА

**А.Д. Бочковой,**

доктор сельскохозяйственных наук

**Т.С. Антонова,**

доктор биологических наук

**В.А. Камардин,**

кандидат сельскохозяйственных наук

**Н.М. Арасланова,**

кандидат сельскохозяйственных наук

**И.И. Ветер,**

кандидат сельскохозяйственных наук

**С.З. Гучетль,**

кандидат биологических наук

**Т.А. Челюстникова,**

старший научный сотрудник

ГНУ ВНИИМК Россельхозакадемии  
Россия, 350038, Краснодар, ул. Филатова, д. 17  
Тел.: (861) 254-23-33, e-mail: vniimk-centr@mail.ru

Проведена оценка генетической чистоты 138 партий семян родительских форм и гибридов первого поколения подсолнечника селекции ВНИИМК. Использовались методы полевого и тепличного грунтконтроля, анализа спектра изоферментов и оценка устойчивости к расе 330 возбудителя ложной мучнистой росы.

Показана высокая эффективность лабораторного метода – анализа спектра изоферментов в определении генетической чистоты партий семян самоопыленных линий. Уровень гибридности у простых межлинейных гибридов можно также адекватно оценить методом оценки устойчивости к определенной расе (330) возбудителя ложной мучнистой росы.

Анализ генетической чистоты партий семян трехлинейных гибридов методом оценки устойчивости к ложной мучнистой росе может использоваться лишь как дополнение к полевому грунтконтролю.

Установлена высокая сопоставимость результатов оценки стерильных материнских форм по показателю закрепление стерильности методами тепличного и полевого грунтконтроля.

The efficiency of different methods of determination of the genetic purity of the seed lots of self-

pollinated lines and hybrids of the F1 generation of sunflower. Bochkovoy A.D., Antonova T.S., Kamardin V.A., Araslanova N.M., Veter I.I., Guchetl S.Z., Chelyustnikova T.A.

The evaluation of genetic purity of 138 seed lots of parental forms and hybrids of the F1 generation of sunflower of VNIIMK's breeding was conducted. For this purpose there were used the methods of field and greenhouse control, analysis of isoenzymes' spectrum and evaluation of resistance to the race 330 of downy mildew pathogen.

The high efficiency of the laboratory method, the analysis of isoenzymes' spectrum, in determination of the genetic purity of seed lots of self-pollinated lines is shown. The level of hybridity in simple hybrids can also be adequately estimated by using the method of evaluation of resistance to a particular race (330) of downy mildew pathogen.

The analysis of genetic purity of the seed lots of three-way hybrids by means of evaluation of resistance to downy mildew can only be used as a supplement to the field control.

The high comparability of evaluation results of sterile female forms in terms of "sterility fixation" by means of greenhouse and field control was determined.

*Ключевые слова:* подсолнечник, семеноводство, самоопыленные линии и гибриды, генетическая чистота, методы определения

УДК 633.854.78:631.52:632

Качество семян подсолнечника – это комплексный показатель, включающий в себя большое число параметров. Условно их можно разделить на две крупные категории – посевные качества (влажность, наличие механических примесей и патогенного начала наиболее вредоносных болезней, всхожесть и масса 1000 семян) и урожайные свойства, зависящие от генетической чистоты селекционного материала и экологических условий его выращивания.

Система контроля посевных качеств семенного материала отработана в Российской Федерации достаточно хорошо. По некоторым показателям требования к качеству семян в нашей стране находятся на более высоком уровне по сравнению с зарубежными государствами. Это касается, прежде всего, контроля над наличием инфекционного начала фомопсиса на семенах.

В то же время разработка критериев оценки уровня генетической чистоты и внедрение их в практику первичного и промышленного семеноводства гибридного подсолнечника в настоящее время пока еще не соответствуют современным требованиям [1].

По мнению В.И. Алгилина [2], выполнение такой работы является «важнейшим элементом сертификации семян», одной из необходимых предпосылок соответствия международным нормам контроля их качества.

Существует ряд международных организаций, регламентирующих применение нормативных актов в области семеноводства [3]. Важнейшими из них являются Организация экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), Международная ассоциация по семенному контролю (ISTA), Международный союз по охране новых сортов растений (UPOV), Международная федерация по торговле семенами (FIS) и некоторые другие.

Уже на первом этапе внедрения гибридов подсолнечника в США общепринятой процедурой оценки качества семян самоопыленных линий и первого поколения гибридов явилось проведение грунтового контроля. По свидетельству D.L. Smith [4], такая работа выполнялась во Флориде, Мексике, Южной Африке и на Гавайских островах. Тогда же был определен оптимальный размер выборки растений для анализа одного образца.

Проведение полевого грунтового контроля до начала реализации семян в условиях Российской Федерации сопряжено с большими трудностями, так как его необходимо проводить в зимний период. По этой причине в ГОСТ Р 52325-2005 «Семена сельскохозяйственных растений. Сортные и посевные качества» внесены обязательные требования только по стерильности материнских форм гибридов подсолнечника [5]. Ответственность за проведение грунтового контроля по показателю «Закрепление стерильности» возлагается при этом на оригинаторов. Во ВНИИМК

такая оценка проводится в осенне-зимний период в камерах искусственного климата.

Инструкцией по апробации сортовых посевов предусмотрено разрешить учреждениям-оригинаторам «применять для определения уровня гибридности семян первого поколения, помимо грунтового контроля, другие методы определения генетической чистоты, прошедшие апробацию и обладающие достаточной надежностью и утвержденные в установленном порядке» [6].

Разработка экспресс-методов определения генетической чистоты самоопыленных линий и уровня гибридности семян первого поколения посредством анализа биохимических маркеров началась вскоре после широкого внедрения гибридов в производство [7–10].

На первом этапе использовался метод электрофореза запасных белков (гелиантининов) и изоферментов. Так, в работах И.Н. Анисимовой с соавторами [7], а также других исследователей [10–12] подтверждена эффективность таких методов анализа при оценке генетической чистоты селекционного материала и партий семян из звеньев первичного и промышленного семеноводства.

Z. Nikolic et al. [13] считают, что особенно эффективными эти методы могут быть при решении проблем семеноводства, таких как установление несанкционированного смешивания семян линий или гибридов, неконтролируемого переопыления, ошибок при репродукции и т.д.

В последние годы для идентификации селекционного материала подсолнечника стали использовать ДНК-маркеры [14].

Н.М. Pallavi et al. [15] считают, что биохимические маркеры, такие как спектр изоферментов или запасных белков, в наименьшей степени подвержены влиянию условий внешней среды, однако обладают ограниченным полиморфизмом и вследствие этого не позволяют установить различия между близкородственным материалом. В то же время ДНК-маркеры лишены таких ограничений. Воспроизводимость результатов анализа генетиче-

ской чистоты по биохимическим маркерам по сравнению с данными полевого грунтконтроля до сих пор является дискуссионным вопросом.

Целью данной работы было сопоставление результатов оценки генетической чистоты партий семян самоопылённых линий и гибридов первого поколения подсолнечника селекции ВНИИМК, выполненной разными методами.

**Материалы и методы.** Полевые опыты проводили на ЦЭБ ВНИИМК в 2011–2013 гг. Анализ спектра изоферментов и устойчивости к ложной мучнистой росе проводили в лаборатории иммунитета и электрофореза отдела селекции гибридного подсолнечника ВНИИМК по общепринятым методикам [14; 17]. Степень стерильности ЦМС-аналогов материнских форм гибридов подсолнечника определяли методом грунтконтроля в камерах искусственного климата ВНИИМК. Отбор образцов семян проводили в соответствии с ГОСТ 12036–85.

Для сравнения разных методов оценки были изучены 138 партий семян родительских форм и первого поколения гибридов подсолнечника.

Метод электрофореза изоферментов использовался для определения генетической чистоты партий семян 12-и фертильных материнских линий-закрепителей, 11-и ЦМС-аналогов материнских линий, 8-и отцовских линий-восстановителей фертильности, 42-х простых межлинейных гибридов и 45-и трёхлинейных гибридов подсолнечника. Для данного анализа использовалась выборка из трёх повторностей по 100 проростков каждой анализируемой партии.

Методом тепличного грунтконтроля по показателю «закрепление стерильности» оценено 11 образцов ЦМС-аналогов материнских линий и 9 образцов стерильных простых гибридов – материнских форм трёхлинейных гибридов.

Методом полевого грунтконтроля была оценена генетическая чистота всех указанных выше образцов с использованием выборки из 500 растений по каждому.

**Результаты и обсуждение.** По результатам исследований, проведенных во ВНИИМК, были составлены изоферментные паспорта 32 самоопыленных линий – родительских форм районированных и перспективных гибридов подсолнечника [14]. Коллекция линий и гибридов была паспортизирована по 7 изоферментным локусам – 75 % образцов имели изоферментные спектры, отличающиеся друг от друга. Это позволяет с достаточно большой точностью идентифицировать отдельные генотипы. Партии семян первого поколения простых межлинейных гибридов подсолнечника проверяют во ВНИИМК также посредством анализа их устойчивости к определенной расе такого узкоспециализированного патогена, как возбудитель ложной мучнистой росы, при условии, что донором устойчивости является лишь одна отцовская форма [17]. Этот метод определения является основным при анализе генетической чистоты семян первого поколения трёхлинейных гибридов, поскольку идентифицировать их посредством анализа изоферментов достаточно трудно вследствие гетерозиготного состояния их материнской формы.

Проведенные нами исследования показали, что оценка семян родительских форм методом анализа спектра изоферментов в большинстве случаев совпадает со стандартом – полевым грунтконтролем (табл. 1).

Таблица 1

**Уровень генетической чистоты самоопыленных линий подсолнечника при оценке разными методами**

ВНИИМК, 2011–2013 гг.

Самоопылённые линии	Количество образцов, шт.	Типичность, %		
		полевой грунтконтроль (стандарт)	метод анализа спектра изоферментов	± к стандарту
Фертильные материнские линии-закрепители стерильности	12	99,2±0,3	97,1±1,4	-2,1*
ЦМС-аналоги материнских линий	11	94,9±3,4	93,4±2,3	-1,5
Отцовские линии-восстановители фертильности	8	99,7±0,4	96,5±3,0	-3,2

*Примечание:* \* – достоверно на 95 %-ном уровне вероятности

Получаемые в отдельных случаях заниженные показатели типичности при оценке методом изоферментов можно объяснить как возможной неоднородностью линий по составу изоферментов, так и относительно небольшой выборкой (100 семян) при проведении анализа. Однако использование выборки такого размера обусловлено экономической целесообразностью. Кроме того, по расчётам, выполненным в работе С.З. Туркав [18], использование 5–7 изоферментных систем при выборке 100 семян позволяет оценивать генетическую чистоту партии с точностью до 5 % допущения ошибочных заключений. Приближение к 1 %-ной вероятности допущения ошибочных заключений приводит к повышению точности оценки, но ведёт и к увеличению выборки из партии семян, а следовательно, к большей затрате дорогостоящих средств для анализа и времени его исполнения.

Таким образом, высокая эффективность лабораторного метода определения уровня генетической чистоты самоопылённых линий подсолнечника посредством анализа спектра изоферментов позволяет избежать трудоёмкого полевого грунтконтроля в практике селекционно-семеноводческой работы с гибридным подсолнечником.

Наряду с методом определения изоферментного состава, во ВНИИМК используется анализ генетической чистоты семян первого поколения гибридов, основанный на дифференцированной устойчивости родительских форм к определенной расе (330) возбудителя ложной мучнистой росы. При сравнении этих двух методов оказалось, что оценки гибридности семян простых межлинейных гибридов практически совпадают (табл. 2), хотя и несколько занижены по сравнению с полевым грунтконтролем.

При анализе партий семян трехлинейных гибридов, имеющих более сложную генетическую природу, метод оценки устойчивости к ложной мучнистой росе даёт меньшие цифры по сравнению с полевым грунтконтролем. Этот метод может использоваться лишь как дополни-

тельный к полевому или тепличному грунтконтролю.

Таблица 2

**Уровень гибридности семян гибридов первого поколения подсолнечника при оценке разными методами**

ВНИИМК, 2011–2013 гг.

Гибриды	Количество образцов, шт.	Гибридность, %		
		полевой грунтконтроль (стандарт)	метод анализа спектра изоферментов	метод анализа устойчивости к расе 330 возбудителя ЛМР
Простые межлинейные	42	88,7±8,7	80,5±4,2	82,2±5,2
Трехлинейные	45	86,4±3,4	-	74,2±4,2

Необходимо также отметить, что анализ генетической чистоты трехлинейных гибридов методом определения изоферментного состава не обладает достаточной точностью и не может быть рекомендован для использования в арбитражных оценках.

Заблаговременная проверка материнских форм гибридов подсолнечника по показателю закрепление стерильности является обязательным требованием при сертификации семян. По этой причине во ВНИИМК ежегодно проводится оценка стерильных материнских форм методом грунтконтроля в теплице. Сравнение этого метода со стандартом (полевой грунтконтроль) показало их высокую сопоставимость (табл. 3).

Таблица 3

**Определение уровня закрепления стерильности у материнских форм гибридов подсолнечника методами полевого и тепличного грунтконтроля**

ВНИИМК, 2011–2013 гг.

Материнские формы гибридов	Количество образцов, шт.	Стерильность, %		
		полевой грунтконтроль (стандарт)	грунтконтроль в теплице	± к стандарту
ЦМС-аналоги материнских линий	11	95,4±0,8	97,7±1,2	-2,3
Стерильные простые гибриды – материнские формы трехлинейных гибридов	9	95,2±0,6	96,2±1,0	-1,0

Таким образом, установлена высокая сопоставимость результатов оценки стерильных материнских форм по показателю закрепление стерильности методами полевого и тепличного грунт-контроля. Оба применённых лабораторных метода определения генетической чистоты партий семян в сочетании с тепличным грунтконтролем вполне адекватно могут заменять полевой грунтконтроль, значительно облегчая выполнение задач в звеньях первичного семеноводства подсолнечника.

#### Список литературы

1. *Малько А.М.* Анализ состояния качества семян подсолнечника в России и оптимизация процесса сертификации для его повышения // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – Краснодар, 2004. – Вып. 2 (131). – С. 47–53.
2. *Алгинин В.И.* Государственная политика в области семеноводства в России // Сб. докл. междунар. науч.-прак. конф. «Семя». Тезисы. – М.: ИКАР, 1999. – С. 3–10.
3. *Березкин А.Н.* Зарубежный опыт построения законодательной базы семеноводства // Сб. докл. междунар. науч.-прак. конф. «Семя». Тезисы. – М.: ИКАР, 1999. – С. 88–90.
4. Planting seed production. In: Sunflower science and technology / D.L. Smith, J.F. Carter (ed.). – Madison, Wisconsin, USA, 1978. – P. 371–386.
5. ГОСТ Р 52325-2005. Семена сельскохозяйственных растений. Сортовые и посевные качества. – М.: Стандартинформ, 2005. – С. 9–10.
6. Инструкция по апробации сортовых посевов, МСХ РФ. – М., 1995. – С. 51–53.
7. *Анисимова И.Н., Лоскутов А.В., Боровкова И.Г.* Идентификация линий подсолнечника методами электрофореза гелиантинина и изоферментов // Доклады ВАСХНИЛ. – 1991. – № 6. – С. 12–15.
8. Sunflower seed 11S globulin (Helianthinin) as genetic marker / I.N. Anisimova // Proc. 13th Int. Sunfl. Conf. – Pisa, Italy, 1992. – P. 506–512.
9. Isozymes, tocopherols and fatty acids as seed biochemical markers of genetic purity in sunflower / Loskutov A., Demurin Ya., Obratsov I., Bochkarev N., Turkav S., Efimenko S. // Helia. – 1994. – V. 17. – № 21. – P. 5–10.
10. Isozymic variability of self-pollinate sunflower (*Helianthus annuus* L.) Lines / Zlorolika M., Nolic Z., Turkav S., Milosevic M., Graovak M., Skoric D. // Helia. – 1996. – V. 19. – № 24. – P. 113–120.
11. Isozymes as markers for differentiating sunflower genotypes / Chikkadevaiah, and Nandini R. // Helia. – 2003. – V. 26. – № 39. – P. 51–58.
12. Use of albumin markers for defining genetic purity of sunflower using molecular markers / Aksyonov I.V. // Helia. – 2005. – V. 28. – № 43. – P. 43–48.
13. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins / Nolic Z., Vujakovic M., Jevtic A. // Helia. – 2008. – V. 31. – № 48. – P. 47–54.
14. *Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Рамазанова С.А., Антонова Т.С.* Молекулярно-генетическая характеристика инбредных линий подсолнечника по изоферментным маркерам и ДНК-профилям // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – Краснодар, 2004. – Вып. 2 (131). – С. 42–46.
15. Identification of SSR markers for hybridity and seed genetic purity testing in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / Pallavi H.M., Gowda R., Shadakshari Y.G., Bhanuprakash K., Vishwanath K. // Helia. – 2011. – V. 34. – № 54. – P. 59–66.
16. *Антонова Т.С.* Селекция подсолнечника на иммунитет // История научных исследований во ВНИИМК за 90 лет (изд. 2-е испр. и доп.). – Краснодар, 2003. – С. 253–272.
17. *Бочковой А.Д.* Гибридный подсолнечник // История научных исследований во ВНИИМК за 90 лет (изд. 2-е испр. и доп.). – Краснодар, 2003. – С. 23–44.
18. *Туркав С.З.* Генетика изоферментов в селекции гибридного подсолнечника: автореф. дис. ... к. б. н. – С.-Пб, 1995. – 16 с.